Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Zur Identität des polyvalenten Proteaseninhibitors aus Schafslunge mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen

(Isolierung, chemische Eigenschaften und Aminosäure-zusammensetzung, Verhalten gegenüber Enzymen und pharmakokinetisches Verhalten)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Brigitte Schramm
aus
München / Bayern

München 1974

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz
Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1974

UNIV. LEIDEN BIBL.

Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 351, S. 139–144, Februar 1970

Zur Identität des polyvalenten Proteaseinhibitors aus Schafslunge mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen

HANS FRITZ*, BRIGITTE GREIF**, WOLFGANG SCHRAMM, KARL HOCHSTRASSER und EUGEN WERLE

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

(Der Schriftleitung zugegangen am 7. November 1969)

Zusammenfassung: Der aus Schafslungen isolierte Trypsin-Kallikrein-Inhibitor besitzt dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen (s. Tabelle). Beide Inhibitoren stimmen auch in ihrem Verhalten bei der Elektrophorese und bei der Inhibierung von Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein überein. Die Reindarstellung des Inhibitors aus Schafslunge wird durch seine geringe Konzentration in den Extrakten und die damit verbundene Assoziatbildung mit sauren Substanzen erschwert.

Summary: *On the identity of the polyvalent protease inhibitor from sheep lung with the trypsin-kallikrein inhibitor from bovine organs.* Trypsin-kallikrein inhibitor from sheep lung possesses the same amino acid composition as trypsin-kallikrein inhibitor from bovine organs (see Table). The two inhibitors also show identical behaviour in electrophoresis and in the inhibition of trypsin, chymotrypsin, plasmin and kallikrein. Purification of the inhibitor from sheep lung was made difficult by its low concentration in the extracts and the consequent formation of associates with acidic materials.

Nach Untersuchungen von WERLE[1] enthalten Schafslungen, ebenso wie verschiedene Rinderorgane[1,2], einen Hemmstoff für Trypsin und Kallikrein. Da angereicherte Inhibitorpräparate aus Schafslunge sich nach intravenöser Injektion im Organismus anders verteilen[3] als der polyvalente Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, haben wir den Trypsin-Hemmstoff aus Schafslunge isoliert und seine Eigenschaften mit denen des Inhibitors aus Rinderorganen verglichen.

Enzyme:
Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)
Kallikrein (EC 3.4.4.21)
Plasmin (EC 3.4.4.14)
Trypsin (EC 3.4.4.4)

* Postanschrift: Priv.-Doz. Dr. H. FRITZ, D-8 München 15, Nußbaumstraße 20.

** Der Arbeit liegt die Dissertat. von BRIGITTE GREIF zugrunde.

[1] E. WERLE, diese Z. **338**, 228 [1964].

[2] R. VOGEL, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, Natürliche Proteinasen-Inhibitoren, Thieme-Verlag, Stuttgart 1966. Dieselben, Natural Proteinase Inhibitors, Academic Press, New York 1968.

[3] H. FRITZ, K.-H. OPPITZ, D. MECKL, B. KEMKES, H. HAENDLE, H. SCHULT u. E. WERLE, diese Z., **350**, 1541 [1969].

Material und Methoden

Schafslungen (Schlachthofmaterial, München*); Kieselguradsorbat von Extrakten aus Schafslungen (Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld**); A-Trypsinharz, hergestellt nach l. c.[4]; Carboxymethylcellulose (Serva); Sephadex G-50, fine (Pharmacia); Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Laboratories); Trypsin, Plasmin und α-Chymotrypsin (Novo Industrie); Kallikrein aus Schweinepankreas, hergestellt nach l. c.[5].

Die Bestimmung der Aktivität und Hemmung von Trypsin (Substrat: N^{α}-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid) er-

* Wir danken Herrn Dr. HELMUT SCHNEIDAWEND, Schlachthof München, für die Überlassung der Schafslungen.

** Wir danken der Firma Bayer für die Überlassung des Kieselguradsorbates.

[4] H. FRITZ, M. GEBHARDT, E. FINK, W. SCHRAMM u. E. WERLE, diese Z. **350**, 129 [1969].

[5] H. FRITZ, I. ECKERT u. E. WERLE, diese Z. **348**, 1120 [1967].

folgte nach l. c.[6, 7] (1 IU entspricht der Hemmung der Aktivität von ca. 1 mg Trypsin), von Chymotrypsin [Substrat: *N*-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-*p*-nitroanilid] nach l. c.[7, 8] (1 IU entspricht der Hemmung der Aktivität von ca. 20 mg α-Chymotrypsin), von Plasmin (Substrat: N^{α}-Benzoyl-L-arginin-äthylester) nach l. c.[7, 9] (1 IU entspricht der Hemmung der Aktivität von ca. 2 Novo-Einheiten Plasmin) und von Kallikrein (Substrat: N^{α}-Benzoyl-L-arginin-äthylester) nach l. c.[7, 10] (1 IU entspricht der Hemmung der Aktivität von ca. 10 biologischen Kallikreineinheiten[11]).

Ergebnisse

1. Gewinnung der Extrakte

Schafslungen wurden wie bei der Gewinnung der Pankreas-Inhibitoren[6,8] aufgearbeitet, jedoch ohne die sauren Extrakte auf 60°C zu erhitzen. Aus dem Inhibitorgehalt der Extrakte berechnete sich der Inhibitorgehalt des Lungengewebes zu ca. 20 IU für Trypsin/kg Schafslunge.

Vom Kieselguradsorbat wurde der Inhibitor wie bereits beschrieben[12] eluiert. 1 g des Kieselguradsorbates enthielt 700—800 IU für Trypsin, was einem Gehalt von 15—20 IU/kg Schafslunge entspricht. Die Extrakte wurden über Sephadex-G-50-Säulen (9×35 cm) in Gegenwart von 0,02M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6, ohne Inhibitorverlust filtriert. Das den Inhibitor enthaltende Eluat wurde im Vakuum-Rotationsverdampfer konzentriert.

2. Anreicherung des Inhibitors über wasserunlösliches Trypsinharz

Die Bindung des Inhibitors an wasserunlösliches polyanionisches Trypsinharz und die Dissoziation des Inhibitor-Trypsinharz-Komplexes erfolgte unter den von uns beschriebenen Bedingungen in Gegenwart von 0,3—0,4M Salz-Pufferlösungen[4]. Bezogen auf die vom Harz gebundene Inhibitormenge wurden bei der Dissoziation 92—97% (Extrakte aus Kieselguradsorbaten) bzw. 50 bis 56% (Extrakte aus Lungengewebe) abgelöst.

3. Fraktionierung durch Gelfiltration

Die bei Schritt 2 anfallenden sauren Inhibitorlösungen wurden mit 2N NaOH neutralisiert und konzentriert. Wurden die konzentrierten Inhibitorlösungen sofort über Sephadex-G-50-Säulen fraktioniert, so trat nur 1 Inhibitorpeak im Eluat auf (Abb. 1). Nach längerem Stehenlassen der konzentrierten Inhibitorlösungen *vor* der Fraktionierung traten jeweils 2 Inhibitorpeaks im etwa gleichen Intensitätsverhältnis auf. Bei Rechromatographie nach nur kurzzeitigem Stehenlassen fielen die beiden Fraktionen jeweils einheitlich an, nach längerem Stehenlassen traten bei der Rechromatographie jeder der beiden Fraktionen im Eluat wieder je 2 Inhibitorfraktionen auf. Wir führen dies auf eine reversible Assoziation des Inhibitors zurück (vgl. Diskussion).

Die nach der Gelfiltration anfallenden Inhibitorfraktionen (Präparat A) wurden lyophilisiert. Die spezif. Aktivität betrug danach 1,3—1,8 IU für Trypsin/mg Einwaage. Bei der Bestimmung der Molekulargewichte mit Hilfe der Gelfiltration unter den von uns früher angewandten Bedingungen[13] fanden wir in saurer Lösung (pH 3,5) einen Wert von 6900 und in Lösung vom pH 7,8 einen Wert von 7600. Die bei der Aminosäureanalyse erhaltenen Werte sind in der Tabelle angegeben. Dieses sog. Präparat A (spezif. Aktivität: 1,3—1,8 IU/mg) unterliegt nach intravenöser Injektion im Organismus einer anderen Verteilung als das analysenreine Präparat B_{III} (spezif. Aktivität: 3,5 IU/mg, s. u. und Abb. 2); außerdem trennt sich Präparat A bei der Elektrophorese (0,02M Boratpuffer, pH 8,0) in 2 nahe beieinanderliegende Fraktionen auf (s. u.).

4. Fraktionierung über CM-Cellulose

Bei der Fraktionierung der nach der Gelfiltration anfallenden Inhibitorpräparate über CM-Cellulose wurden 3 Fraktionen erhalten (Abb. 2), die die gesamte auf die Säule aufgetragene Inhibitoraktivität enthielten: Frakt. I enthielt 8 IU (4,5%), Frakt. II 45 IU (25%) und Frakt. III 127 IU (70,5%). Die Frakt. II und III wurden im Vakuum-Rotationsverdampfer konzentriert und über Bio-Gel-P-2-Säulen (3,2×31 cm, Säulenmantel aus Plexiglas) mit 0,01M Essigsäure als Elutionsmittel entsalzt, die

---

[6] H. Fritz, G. Hartwich u. E. Werle, diese Z. **345**, 150 [1966].

[7] H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., im Druck.

[8] H. Fritz, F. Woitinas u. E. Werle, diese Z. **345**, 168 [1966].

[9] Analog d. Vorschrift f. d. Kallikreinbestimmung, l.c.[10].

[10] I. Trautschold u. E. Werle, diese Z. **325**, 48 [1961]; I. Trautschold u. E. Werle, in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 880, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962.

[11] H. Kraut, E. K. Frey u. E. Werle, Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke-Verlag, Stuttgart 1968.

[12] Siehe Vorschrift, l. c.[4], S. 134, Abschnitt 5a.

[13] H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, diese Z. **342**, 253 [1965].

inhibitorhaltigen Eluate lyophilisiert. Die so erhaltenen Inhibitorpräparate B besitzen folgende spezif. Aktivitäten: Frakt. II 2,8 IU/mg und Frakt. III 3,5 IU/mg. In der Tabelle ist die Aminosäurezusammensetzung der beiden Fraktionen angegeben.

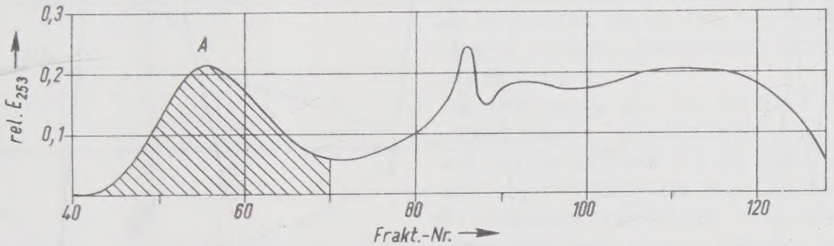

Abb. 1. Gelfiltration der über wasserunlösliches Trypsinharz angereicherten Inhibitorpräparate.

Bedingungen: Sephadex-G-50-Säulen (1,6×130 cm und 4×120 cm), äquilibriert mit 0,02M Ammoniumacetatlösung, pH 7,0. Elutionsgeschwindigkeit: 10—15 Tropfen/min, Elutionsmenge/Frakt.: 10 m*l*. Schraffierter Bereich: Fraktionen mit Inhibitoraktivität.

Von den auf die Säulen aufgetragenen Inhibitormengen wurden 84—92% in den Inhibitorpeaks (vgl. Text) wieder eluiert.

Aminosäurezusammensetzung der Inhibitorpräparate aus Schafslunge (Angaben in Mol Aminosäure/Mol Inhibitor; Fraktionsbezeichnungen s. Text).

	Inhibitorpräparat B				Inhibitorpräparat A	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen
	Fraktion III gefunden		ganzzahlig	Fraktion II gefunden	gefunden	
	20 h	20 h		20 h	20 h	
Asp	5,16	5,18	5	7,1	6,1	5
Thr	2,92	2,78	3	3,1	2,4	3
Ser	1,14	0,99	1	2,8	2,0	1
Glu	3,07	3,05	3	4,5	3,9	3
Pro	4,03	4,24	4	4,0	5,1	4
Gly	6,00	5,96	6	5,8	4,8	6
Ala	5,82	5,84	6	6,4	2,9	6
Cys	5,42	5,10	6	0[a]	4,1	6
Val	0,90	1,03	1	0,9	0,9	1
Met	0,95	0,90	1	0,4[a]	1,4	1
Ile	1,04[b]	1,84	2	1,9	1,0	2
Leu	2,08	2,14	2	1,8	1,7	2
Tyr	3,79	3,50	4	3,0[a]	3,6	4
Phe	4,09	3,90	4	3,8	3,8	4
Lys	3,89	3,91	4	3,7	2,9	4
Arg	5,64[b]	5,77	6	3,3	4,1	6

a) Diese Aminosäuren wurden während der Hydrolyse infolge des verwendeten, noch salzhaltigen Präparates ganz bis teilweise zerstört.
b) Die langsame Hydrolyse der -Ile-Ile-Arg-Sequenz bedingt die etwas zu niedrigen Ile- und Arg-Werte[14].

14 L. F. KRESS u. M. LASKOWSKI SR., J. biol. Chemistry **242**, 4925 [1967].

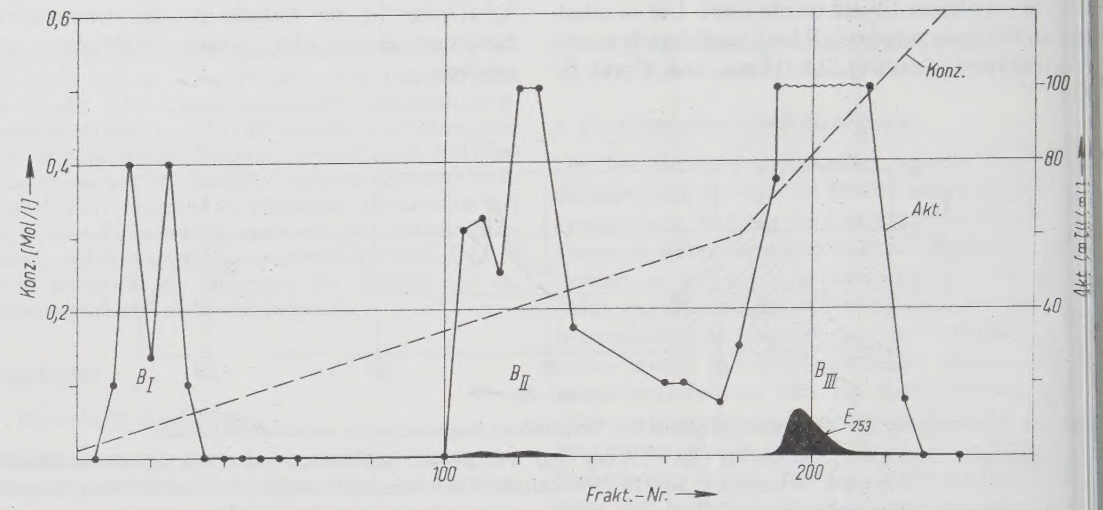

Abb. 2. Fraktionierung des Inhibitorpräparates A über CM-Cellulose (s. Text).

Bedingungen: 1,6×30-cm-Säule, äquilibriert mit 0,01M Triäthanolaminpuffer, pH 6,0. Bei einer Elutionsge schwindigkeit von 12—16 Tropfen/min wurde das Eluat in 10- bis 11-m*l*-Fraktionen gesammelt. Aufgetragen Inhibitormenge: 180 IU des Inhibitors A nach der Gelfiltration in 176 m*l* des Äquilibrierpuffers. Danach wurd mit linearen Puffer-Gradienten eluiert: 1 *l* 0,3M Triäthanolaminpuffer, pH 6,0, in 1 *l* des Äquilibrierpuffers ab Frakt. 180: 250 m*l* 0,6M Triäthanolaminpuffer, pH 6,0 in 250 m*l* des 0,3M Puffers; ab Frakt. 235: 250 m 1,0M Triäthanolaminpuffer, pH 6,0, in 250 m*l* des 0,6M Puffers.

Linke Ordinate: Molarität des Puffers, rechte Ordinate: Inhibitoraktivität.

5. *Elektrophorese*

Bei der elektrophoretischen Untersuchung (Celluloseacetatfolien, 0,05M Boratpuffer, pH 8,0) konnten wir keine Unterschiede zwischen dem Verhalten von Fraktion II, III und dem des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen feststellen (Abb. 3). Beim Inhibitorpräparat A (s. o.) fanden wir dagegen eine Aufspaltung in 2 Fraktionen, die sich zwar gleich stark mit Amidoschwarz anfärbten (E_{546}, Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid/Aceton = 1:1 (V/V)), von denen die rascher wandernde Fraktion jedoch nur $^1/_3$—$^1/_2$ der Inhibitoraktivität der langsamer wandernden Fraktion enthielt.

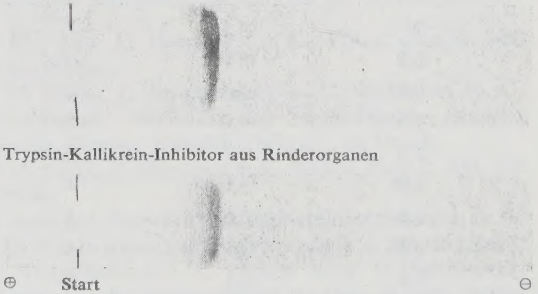

Abb. 3. Elektropherogramme v. Frakt. B_{III} des Inhibitors aus Schafslunge und dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen auf Celluloseacetatfolie in 0,05M Boratpuffer, pH 8,0.

6. *Verhalten gegenüber Enzymen*

Trypsin: Bei der Inkubation von Trypsin (10 mU) mit dem Inhibitorpräparat B (Fraktion III) aus Schafslunge (8 mIU) in 2 m*l* 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, wird das Hemmgleichgewicht erst nach 1—5 min erreicht. Wird zuerst das Substrat (N^α-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid) und dann erst der Inhibitor zum Inkubationsansatz gegeben, so stellt sich das Hemmgleichgewicht ebenfalls erst nach einigen Minuten ein. Die Hemmwirkung des Inhibitors ist in Lösungen von pH 6,0 bis 10,0 gleichbleibend optimal; in stärker alkalischen Lösungen ist sie stark vermindert. Durch Trypsin wird der Inhibitor auch bei längerer Inkubation (37°C) bei pH 7,8 nicht abgebaut. Eine ausführliche Darstel-

ung der Ergebnisse findet sich l. c.[15]. Abb. 4 gibt die in Gegenwart des Substrates N^{α}-Bezoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid erhaltene Hemmkurve wieder. Die spezif. Aktiv. von Frakt. B_{III} entspricht der der reinsten Präparate des Inhibitors aus Schafslunge (spezif. Aktiv. bei 3,6 IU pro mg).

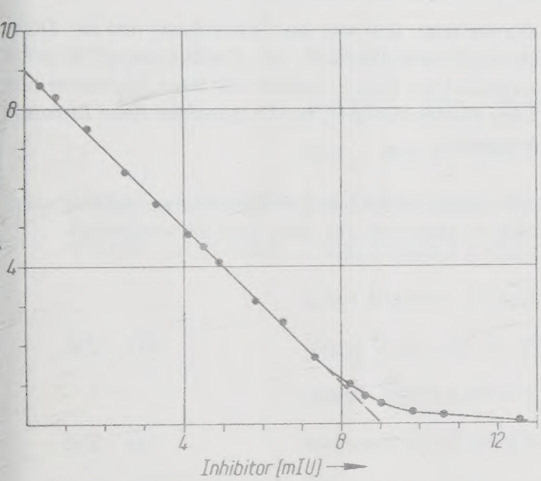

Abb. 4. Hemmkurve des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Schafslunge (Präparat B, Frakt. III, s. Text).
Bedingungen: 9 mU Trypsin (in 0,2 m*l* 0,001N HCl) plus 0,01—0,3 m*l* Inhibitorlösung ad 2,0 m*l* mit 0,2M Triäthanolaminpuffer (plus 0,02M $CaCl_2$), pH 7,8. Die Hemmansätze wurden 5 min bei 25°C inkubiert und die verbleibende Trypsinaktivität (in mU, Ordinate) nach Zugabe von 1,0 m*l* Substratlösung (1 mg N^{α}-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid in dest. Wasser) gemessen. Abszisse: Inhibitoraktivität; als Bezugswert diente der 50proz. Hemmgrad.

Während das Hemmverhalten des Inhibitorpräparates B (Fraktion III) gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin mit dem des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen innerhalb der methodischen Fehlergrenzen identisch ist (1 mg v. Frakt. B_{III} hemmt die Aktivität von 3,4 ± 0,4 mg Chymotrypsin, von 4,8 ± 0,7 mg Kallikrein und von 20 ± 5 Novo-Einheiten Plasmin), trifft dies beim Inhibitorpräparat A nur für die Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin zu. Bezogen auf wirkungsgleiche Mengen gegenüber Trypsin ist die Hemmwirkung von Präparat A gegenüber Kallikrein um ca. 60% geringer.

[15] B. Greif, Dissertat., I. Med. Fakult. d. Univ. München.

Diskussion

Die Primärstruktur des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen[2] wurde in mehreren Arbeitskreisen aufgeklärt[16]. Sieht man von kleineren, wahrscheinlich methodisch bedingten Differenzen ab, so besitzen die aus den verschiedenen Rinderorganen isolierten Hemmstoffe identische Aminosäuresequenzen.

Zur Gewinnung des von Werle in Schafslungen aufgefundenen Kallikreininhibitors verwendeten wir, wie bereits früher bei der Isolierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderleber[17], wasserunlösliches Trypsinharz[4]. Die spezifischen Aktivitäten der nach diesem Anreicherungsschritt erhaltenen Präparate A liegen 50—60% unter der des analysenreinen Inhibitors B (Frakt. III, Tabelle). Gegenüber letzterem ist in Präparat A der Anteil der sauren Aminosäuren Asp und Glu stark erhöht. Durch Chromatographie an CM-Cellulose läßt sich Präparat A im wesentlichen in 2 Inhibitorfraktionen auftrennen: Außer dem analysenreinen Hemmstoff B (Frakt. III, Tabelle) erhält man noch eine Nebenfraktion (II, Tabelle) mit wiederum erhöhtem Asp- und Glu-Gehalt.

Frakt. III des Inhibitorpräparates B aus Schafslunge besitzt dieselbe Aminosäurezusammensetzung und zeigt bei der Elektrophorese dasselbe Verhalten wie der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderlunge (isoelektrischer Punkt bei 10,5; vgl. l. c.[2, 16]). Bei Präparat A dürfte ein Gemisch des reinen Inhibitors mit Assoziaten vorliegen, in denen der stark basische Inhibitor an saure Substanzen (Polypeptide, Nucleinsäuren, Heparin u. dgl.) assoziiert ist. Dafür sprechen sowohl die Auftrennbarkeit von Präparat A in 2 Fraktionen mit unterschiedlicher Hemmaktivität bei der Elektrophorese als auch die Verteilung der Inhibitoren im Organismus der Ratte nach i. v. Injektion: Der analysenreine Inhibitor B (Frakt. III) wird ebenso wie der Inhibitor aus Rinderlunge quantitativ in den Nieren fixiert. Nach Injektion von Präparat A erscheint dagegen ein Teil des Inhibitors im Harn[3] und verhält sich damit

[16] B. Kassell u. M. Laskowski sr., Biochem. biophysic. Res. Commun. **20**, 463 [1965]; F. A. Anderer u. S. Hörnle, J. biol. Chemistry **241**, 1568 [1966]; J. Chauvet, G. Nouvel u. R. Acher, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **92**, 200 [1964]; V. Dlouhá, D. Pospíšilová, B. Meloun u. F. Šorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. **30**, 1311 [1965].

[17] H. Fritz, M. Hutzel u. E. Werle, diese Z. **348**, 950 [1967].

wie die Derivate des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderlunge, deren Basizität durch die Einführung saurer Gruppen abgeschwächt wurde[3,18].
Bei der nach der Chromatographie an CM-Cellulose erhaltenen Nebenfrakt. II dürfte ebenfalls noch ein Assoziat vorliegen, wobei allerdings der Anteil der sauren Substanzen gegenüber Präparat A wesentlich geringer ist. Das Verhalten der Inhibitorpräparate A bei der Gelfiltration im Verlauf der Isolierung spricht weiterhin für eine reversible Assoziatbildung zwischen den Inhibitormolekülen selbst, wobei evtl. saure Substanzen die „Bindeglieder" darstellen. Ähnliche Beobachtungen liegen auch für den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderlunge vor (vgl. l. c.[2]). Bei der Isolierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen machen sich diese Assoziationstendenzen wahrscheinlich deshalb weniger störend bemerkbar, da hier die Konzentration des Inhibitors im Gewebe um mehr als das 20fache höher ist[1,2,15].

Da der reine Inhibitor aus Schafslunge und der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen in allen untersuchten Eigenschaften und ihrer Zusammensetzung übereinstimmen, ist die Annahme ihrer Identität berechtigt.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, SFB-51 München, für Sach- und Personalmittel.

---

[18] H. FRITZ, H. SCHULT u. E. WERLE, in Vorbereitung.

Lebenslauf:

Brigitte Schramm , geb. Greif

17.02.44	Geboren in München als zweites Kind der Ärzte Dr. med. dent. Georg Greif und Dr. med. Elfriede Greif, geb. Maron
1950 - 1954	Volksschule in München
1954 - 1964	Oberrealschule in München (Am Anger) Abitur: 1964
WS 64	Beginn mit dem Studium der Zahnmedizin an der Universität München
WS 65	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
SS 66	Übertritt zur Humanmedizin
SS 67	Ärztliche Vorprüfung
März 68 - - Juni 69	Doktorandin am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München
18.12.1970	Ärztliche Prüfung
30.01.1971	Heirat mit Dr. med. Wolfgang Schramm
09.01.1973	Geburt unserer Tochter Barbara
31.03.1972	Erteilung der Approbation nach Beendigung der Medizinalassistentenzeit im Stadtkrankenhaus Kempten
01.04.72 - - 30.06.73	Assistenzärztin auf der chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Kempten